

Addressee's fax number: 1-703-308-6459

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO)  
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE (OMPI)

## PCT

(Patent Cooperation Treaty)

34, chemin des Colombettes - 1211 Geneva 20 - Switzerland  
Tel (41-22) 338 9111 - Telex 412 912 ompi ch - Facsimile (41-22) 733 5428  
PCT Facsimile (41-22) 740 1435Facsimile/Télécopie

Date : 21 June 2000 (21.06.00) Fax: 1-703-308-6459

RECEIVED

To : Assistant Commissioner for Patents  
In its capacity as Elected Office  
United States Patent and Trademark Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

21 JUN 2000

Legal Staff  
International Division

Attention: Dan Stemmer, PCT Legal Office

From : Ting Zhao Telephone: (41-22) 338 9749  
Concerns: PCT/EP96/05846 Email address: ting.zhao@wipo.int

Number of pages including cover sheet : 25

Dear: Dan Stemmer

As requested by your email of 16 June 2000, enclosed please find copies of the Form PCT/IB/306, Form PCT/IB/331 and the priority document.

With best regards,

  
Ting Zhao  
PCT Examination Section

File copy

## PATENT COOPERATION TREATY

18

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 27 May 1997 (27.05.97)	
Applicant's or agent's file reference: BSS.001	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/EP96/05846	International filing date (day/month/year) 27 December 1996 (27.12.96)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

GERVASI, Gemma  
Notarbartolo & Gervasi  
Corso di Porta Vittoria, 9  
I-20122 Milan  
ITALIE

1. The following indications appeared on record concerning:				
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative				
Name and Address <b>BIOSISTEMA DI PIER LUIGI SPARAPANI &amp; C. SAS</b> Via Per Luco dei Marsi I-67051 Avezzano Italy		State of Nationality		State of Residence
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		Teleprinter No.		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:				
<input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence				
Name and Address <b>MIDIA LIMITED</b> 1st. Floor Channel House Green Street St. Helier Jersey JE4 5UW United Kingdom		State of Nationality		State of Residence
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		Teleprinter No.		
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input checked="" type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority		<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  M. Abidine
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 730.91.11

File copy

## PATENT COOPERATION TREATY

? 7

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AP, EP, AU, BG, BR, CA, CN, CZ, DE, FI,  
GB, HU, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL,  
RO, RU, SE, SK, US, VN

Date of mailing (day/month/year)

12 August 1997 (12.08.97)

in its capacity as elected Office

International application No.

PCT/EP96/05846

Applicant's or agent's file reference

BSS.001

International filing date (day/month/year)

27 December 1996 (27.12.96)

Priority date (day/month/year)

27 December 1995 (27.12.95)

Applicant

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

 in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 July 1997 (16.07.97)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election  was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Marie-José Devillard

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

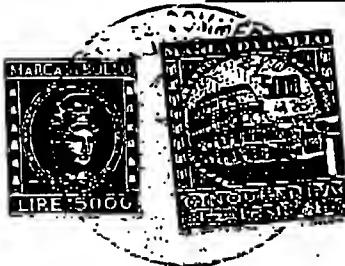
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT/EP REC'D 27 MAR 1997 846

Mod. C.E. - 1-4-7

MODULARIO  
ICA - 101

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
**DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**



REC'D	27 MAR 1997
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. RM95 A 000850

**PRIORITY DOCUMENT**

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

17 FEB. 1997

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

*Cesca* *J. J. S.*

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA E DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

marca  
di  
bozza

N.G.

SA

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione BIOSISTEMA di Pier Luigi Sparapani & C. Sas  
Residenza Avezzano (AQ)codice 01345380669

## 2) Denominazione \_\_\_\_\_

codice \_\_\_\_\_

Residenza \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Maria Vittoria Primiceri ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza NOTARBARTOLO & GERVASI S.r.l.  
via Savoia n. 82 città Roma cap 00198 (provi) RM

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via Come sopra n. 0 città 00198 cap 00198 (provi) RM

## D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/cell) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

Prodotto derivato da latte sostanzialmente esente da betacaseina di mammifero non umano e relativo uso.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO

SE Istanza DATA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI cognome nome

cognome nome

1) POZZILLI Paolo \_\_\_\_\_ 31 \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_ 41 \_\_\_\_\_

## F. PRIORITY

nazione o organizzazione \_\_\_\_\_

tipo di priorità \_\_\_\_\_

numero di domanda \_\_\_\_\_

data di deposito \_\_\_\_\_

allegato

i/R

SCIGLIMENTO RISERVE

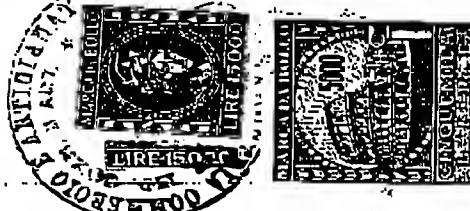
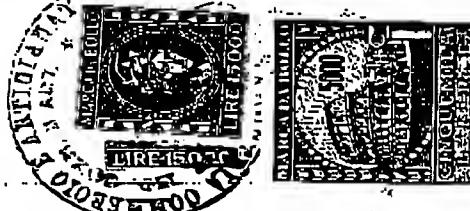
Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

1) Nessuna \_\_\_\_\_

2) \_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione \_\_\_\_\_

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna \_\_\_\_\_

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc 1.	1	FIG.	fig. 19	disegno con disegno estendibile descrizione e rivendicazione obbligatorio i esemplari
Doc 2.	1	XX	01	disegno obbligatorio se è fatto in descrizione 1 esemplare
Doc 3.	1	FIG.		lettera di incarico procura o riferimento scorsa generale
Doc 4.	0	FIG.		designazione inventore
Doc 5.	0	FIG.		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc 6.	0	FIG.		autorizzazione o atto di cessione
Doc 7.	0	FIG.		nominativo completo del richiedente

SCIGLIMENTO RISERVE  
Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_8) importo di versamento totale lire Trecentosessantacinquemila- obbligatorioCOMPILATO IL 22 12 1995 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I) D.ssa Maria Vittoria PrimiceriCONTINUA SI NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

PM 95 A 000850

Roma

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

L'anno millenovemila N vantacinque

Reg A VENTISETTE

nel mese di DicembreSono chiedente(s) dichiaro(ri) di presentare a me sottoscritto la preghiera di pubblicazione della n. 00, soggetto alla concessione dal brevetto sovvenzionato

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Pecile Confucio

L'UFFICIALE ROGANTE

E.Ufficio Rogante

BSS.001

PROSPETTO A

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

RM 195 A 00085

REG. A  
NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

27/12/1995

DATA DI RILASCIO

27/12/1995

## D. TITOLO

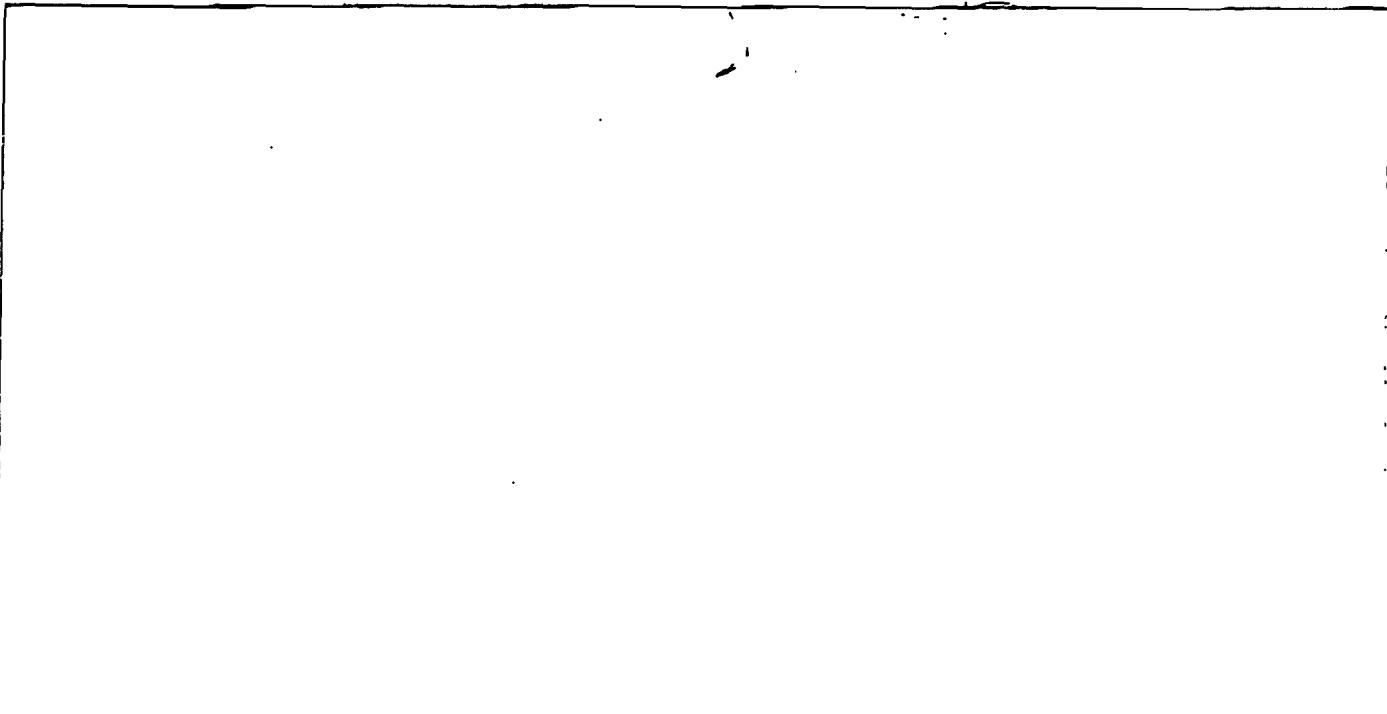
Prodotto derivato da latte, sostanzialmente esente da betacaseina di mammifero non umano e relativo uso.

## E. RIASSUNTO

La presente invenzione è relativa ad un prodotto, derivato da latte, sostanzialmente esente da beta-caseina di mammifero non umano. L'invenzione è anche relativa all'uso di tale prodotto, in particolare l'uso in campo dietetico-alimentare, più in particolare per la prima infanzia nella prevenzione del diabete insulino-dipendente.



## M. DISEGNO



BSS.001

**Notarbartolo & Gervasi S.r.l.**

## **DESCRIZIONE**

della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:  
"PRODOTTO DERIVATO DA LATTE, SOSTANZIALMENTE ESENTE DA BETA-  
CASEINA DI MAMMIFERO NON UMANO E RELATIVO USO"

a nome di BIOSISTEMA di Pier Luigi Sparapani & C. sas  
con sede in Avezzano (AQ)

Inventori designati: Paolo POZZILLI

Depositata il con il n.

\* \* \* \*

### Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad un prodotto, derivato da latte, sostanzialmente esente da beta-caseina di mammifero non umano.

L'invenzione è anche relativa all'uso di tale prodotto, in particolare l'uso in campo dietetico-alimentare, più in particolare per la prima infanzia nella prevenzione del diabete insulino-dipendente.

### Arte nota

E' tecnica ampiamente diffusa quella di ottenere prodotti, in particolare prodotti alimentari per la prima infanzia, a partire da latte di mammiferi non umani, quali mucche, pecore e capre.

La componente base del latte è costituita dalle "caseine", che, nell'accezione più ampia del termine, sono un gruppo di proteine che si ottengono per precipitazione da latte a pH acido e temperatura fino a temperatura ambiente, in genere

BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

rispettivamente circa pH 4,6 e 20°C. Le caseine costituiscono circa l'80% del totale delle proteine nel latte vaccino e circa il 40% p/v nel latte umano. Esse si possono suddividere in tre gruppi principali: alfa-, beta- e kappa-. E' individuabile anche un quarto gruppo costituito dalle gamma-caseine, che derivano dalla beta-caseina a seguito della perdita dei primi 22 amminoacidi. Quindi, nell'abito della presente invenzione, le gamma-caseine saranno considerate come facenti parte del gruppo delle beta.

Le beta-caseine costituiscono circa il 70% p/v di tutte le caseine presenti nel latte umano, mentre nel latte vaccino sono circa il 25% p/v.

Delle beta-caseine bovine si conoscono e sono state caratterizzate alcune varianti genetiche, fra cui: A1, A2, A3, B, C, D ed E. Per la produzione industriale di latte è stata privilegiata la variante genetica A1, variante a più alto contenuto proteico rispetto alle altre, ottenuta per selezione di animali, specialmente mucche.

Da analisi eseguite su "gene data sequencing" si è individuata per la beta-caseina A1 bovina una sequenza amminoacidica in posizione 63-68, omologa alla corrispondente sequenza 54-59 della beta-caseina umana.

Analogia situazione è stata riscontrata per la variante A2.

Le varianti A1 e A2 della beta-caseina presentano inoltre omologia di sequenza in quel tratto (almeno al 90%) con una

BSS.001

Notarbartolo &amp; Gervasi S.r.l.

*UR*

proteina specifica delle cellule producenti insulina del pancreas (GLUT 2).

Secondo gli autori, a carico della sequenza 63-68 delle beta-caseine A1 e A2, e più in generale a carico di sequenze analoghe in altri tipi di caseine, quali ad esempio la A1, A2, A3, B, C e D, si potrebbe determinare una risposta del sistema immunitario con produzione di anticorpi anti beta-caseina e con linfociti sensibilizzati alla suddetta sequenza. Nei neonati a cui nei primi mesi di vita venga somministrata una dieta a base di latte contenente tale caseina immunogenica, si verificherebbe il riconoscimento, da parte del sistema immunitario, di una proteina specifica delle cellule producenti insulina nel pancreas endocrino (GLUT 2) per un meccanismo di mimetismo molecolare appunto con la sequenza omologa della beta-caseina.

Sulla base di tale ipotesi si è sviluppata una ricerca, tesa a mettere a punto prodotti derivanti dal latte, o latte stesso, sostanzialmente esenti da beta-caseina non umana, e, più specificatamente, prodotti contenenti beta-caseina proveniente da mammiferi non umani che non risulti immunogenica per mimetismo molecolare (cross-reattività) con la proteina GLUT 2.

#### Sommario dell'invenzione.

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione un prodotto derivato da latte, o latte stesso, sostanzialmente esente da beta-caseine di mammifero non umano avente caratteristiche immunogeniche nel senso sopra specificato.

BSS.001

Notarbartolo &amp; Gervasi S.r.l.

Altro oggetto dell'invenzione è un prodotto derivato da latte, o latte stesso, comprendente, o additivato con, almeno una beta-caseina modificata di mammifero non-umano senza caratteristiche immunogeniche nel senso sopra specificato.

Ancora altro oggetto dell'invenzione è l'uso di tale prodotto, in particolare l'uso in campo dietetico-alimentare.

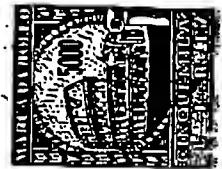
Ulteriore oggetto dell'invenzione è l'uso di un prodotto derivato da latte, o latte stesso, sostanzialmente esente da beta-caseine di mammifero non umano, oppure comprendente almeno una beta-caseina modificata e non immunogena, per realizzare un alimento da somministrare, in genere nella prima infanzia, per la prevenzione del diabete insulino-dipendente.

Ancora altri oggetti dell'invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata dell'invenzione stessa.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nel prosieguo della descrizione verranno sottolineate le sequenze amminoacidiche di interesse per il presente brevetto. Inoltre, la parola "sostanzialmente" sarà usata come sinonimo di presenza di una o più sostanze (quella(e) a cui la parola si riferisce) in quantità compresa fra 0 e 10% in peso).

Come accennato sopra, secondo gli autori esiste una correlazione fra esposizione a latte vaccino e insorgenza di diabete insulino-dipendente a causa di un mimetismo molecolare fra le sequenze amminoacidiche delle beta-caseine A1 e A2 e una proteina specifica delle cellule produttrici insulina, denominata GLUT 2.



BSS.001

Notarbartolo &amp; Cervasi S.r.l.

Tale sequenza è identificata come:

Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn

per la beta-caseina A1 ed è inserita nel seguente frammento più ampio: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn

Per quanto detto precedentemente, tale sequenza è anche presente nella gamma-caseina.

A titolo di esempio vengono date altre corrispondenti sequenze di peptidi immunogenici di beta-caseine diverse da quella sopra menzionata.

Beta-caseina A2 bovina da bos taurus (63-68):

Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn,

inserita nel frammento più ampio:

Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn

Beta-caseina da bos indicus (63-68):

Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn.

Per confronto, la beta-caseina umana ha corrispondentemente la seguente sequenza (48-59):

Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr,

la frazione peptidica presa in considerazione nella presente invenzione essendo identificata come la (54-59):

Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr.

Corrispondentemente le sequenze peptidiche del GLUT 2, il trasportatore del glucosio all'interno delle cellule beta del pancreas producenti insulina, sono le seguenti:

(409-420) Ser-Phe-Phe-Glu-Ile-Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp

BSS.001

Notarbartolo &amp; Cervasi S.r.l.

(412-423) Glu-Ile-Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp-Phe-Met-Val

(414-425) Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp-Phe-Met-Val-Ala-Glu

Dalla descrizione delle sequenze di cui sopra e dagli studi epidemiologici degli stessi autori si ipotizza che la sequenza della beta-caseina A1, B e C e gamma-caseina: Pro-Gly-Pro-Ile-His e i frammenti più ampi che la contengono, come anche le sequenze della beta-caseina A2, A3 ed E: Pro-Gly-Pro-Ile-Pro, siano responsabili dell'induzione di una risposta immunitaria anti beta-caseina che, per mimetismo molecolare (cross-reazione) sarebbe rivolta verso la sequenza omologa del GLUT 2, determinando il danno delle cellule produttrici insulina. Per cui realizzare un latte, o più in generale un prodotto alimentare, contenente beta-caseina non immunogenica e somministrarlo nelle diete, in particolare dei neonati o nella prima infanzia, costituisce una prevenzione del meccanismo patogenico alla base del diabete insulino-dipendente.

Rientrano nell'ambito della presente invenzione, nel senso che non sono considerate patogeniche e con le quali pertanto può essere realizzato un prodotto alimentare conforme all'invenzione, tutte le caseine che non presentano la sequenza: Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro, nel senso che:

- alcuni o tutti gli amminoacidi sono modificati in detta sequenza,
- la beta-caseina non presenta tale sequenza in quanto, ad esempio, è stata rimossa.

BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

- la beta-caseina è modificata in quanto tale sequenza è sostituita con la sequenza della beta-caseina umana.

Tutte le modifiche possono essere fatte applicando le tecniche note di ingegneria genetica e le tecniche classiche biologiche di selezione e incrocio, ad esempio come descritto in WO 93/04171.

Il latte ottenuto, contenente le caseine modificate di cui sopra, può essere somministrato tal quale, oppure può essere trattato con metodi noti in modo che la o le caseine interessate vengano separate e utilizzate per realizzare prodotti alimentari dietetici e farmaceutici.

In particolare i prodotti comprendenti tali caseine sono impiegabili per essere somministrati nella prima infanzia e successivamente come dieta preventiva per il diabete insulino-dipendente.

E' preferibile che, nei prodotti secondo la presente invenzione, il livello di concentrazione della beta-caseina A1 e/o A2 e/o altre beta-caseine immunogeniche, in particolare, recanti la sequenza Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro non sia superiore al 10% in peso.

I prodotti alimentari dell'invenzione possono ad esempio essere, paste alimentari, latte e suoi derivati, proteine tal quali da additivare a prodotti alimentari, il tutto ad esempio analogamente a quanto già esistente in commercio. l'unica modifica essendo la sostituzione delle caseine immunogeniche con le caseine dell'invenzione.

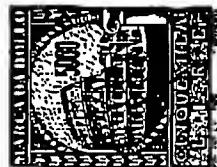
BSS.001

Notarbartolo &amp; Gervasi S.r.l.

Rientrano nell'ambito della presente invenzione anche le proteine vegetali e/o sintetiche, ad esempio quelle derivabili dalla soia, impiegabile per gli scopi dell'invenzione.

Secondo l'insegnamento della presente invenzione è possibile realizzare un prodotto alimentare, farmaceutico, particolarmente per la prima infanzia sostanzialmente esente da beta-caseina recante la sequenza amminoacidica Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro, oppure in cui queste sono inferiori al 10% in peso. Si può anche realizzare un prodotto o un latte secondo le seguenti alternative:

- in cui la beta-caseina è inferiore al 10% in peso, oppure in cui la beta-caseina recante la sequenza amminoacidica Gly-Pro-Ile-His o Gly-Pro-Ile-Pro è inferiore al 10% in peso;
- sostanzialmente esente da beta-caseina recante la sequenza amminoacidica Gly-Pro-Ile-His o Gly-Pro-Ile-Pro e integrato con peptidi derivati dall'idrolisi di proteine animali e/o vegetali e/o sintetiche, prive della suddetta sequenza e relative miscele (domanda di brevetto FR 86-00325, WO 94/06306, WO PI/02539);
- in cui la beta-caseina recante la sequenza amminoacidica Gly-Pro-Ile-His o Gly-Pro-Ile-Pro è inferiore al 10% in peso e integrato con peptidi derivati dall'idrolisi di proteine animali e/o vegetali e/o sintetiche, prive della suddetta sequenza e relative miscele;
- in cui la beta-caseina è priva della sequenza amminoacidica Gly-Pro-Ile-His o Gly-Pro-Ile-Pro perchè prodotta da specie



BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

animali che geneticamente non producono proteine con detta sequenza;

- latte naturalmente privo di beta-caseine perché prodotto con animali geneticamente modificati WO 93/04171;

- latte contenente beta-caseine umane ottenute a partire da microorganismi o animali geneticamente manipolati, come ad esempio descritto nella domanda di brevetto già citata.

Le frazioni proteiche possono derivare da trattamenti chimico-fisici di latte e da caseine liofilizzate, ad esempio per solubilità differenziale, estrazione liquido-liquido, separazione su membrana, separazione chromatografica, come descritto in FR 86-00325 e WO 92/00017. . .

Le integrazioni possono essere effettuate utilizzando beta-caseina ricombinante prodotta con uno qualsiasi dei metodi noti di clonaggio sfruttando lieviti, muffe, batteri, funghi o animali transgenici, come ad esempio descritto in WO 93/04171.

Un processo per l'eliminazione della beta-caseina dal latte è quello chromatografico, come appresso descritto.

Per mezzo di tale processo si separa la beta-caseina a partire da caseina acida e, mediante chromatografia in due stadi, si recuperano poi le restanti frazioni di alfa- e kappa-caseine.

Il processo può essere ottimizzato attraverso le conoscenze del tecnico del ramo.

Tale processo prevede l'impiego, come fase stazionaria, di una resina a scambio ionico, ad esempio del tipo noto in commercio

BSS.001

*Notarbartolo & Acciavasi S.r.l.*

come Sepharose(R) della ditta Pharmacia, con concentrazione nonchè in colonna. La fase mobile è costituita da tampone A:

- Acetato di sodio con concentrazione non inferiore a 10 mM
- urea con concentrazione non inferiore a 2M
- pH compreso fra 5 e 6.

La caseina acida viene sciolta in tampone A a pH non inferiore a 6, con aggiunta di un agente riducente specifico, il ditioltreitololo (DTT). Viene lasciata sotto agitazione per 24 ore, portata a un pH che sia compreso fra 5 e 6 e caricata in colonna. La frazione di beta-caseina non interagisce con la resina ed eluisce in colonna a concentrazione 0 M di NaCl. Non occorre, quindi, effettuare stadi a forza ionica crescente, considerato che si effettua una semplice separazione di beta-caseina dalle altre frazioni, le quali verranno recuperate in isocratica eluendo con tampone B:

- Acetato di sodio con concentrazione non inferiore a 10 mM
- urea con concentrazione non inferiore a 2M
- concentrazione 0,8 M di NaCl
- pH compreso fra 5 e 6.

Le frazioni vengono successivamente diafiltrate per eliminare urea ed altri sali presenti; dopo concentrazione si recuperano le caseine per precipitazione acida e il prodotto umido ottenuto viene liofilizzato.

Gli esempi appresso riportati sono da considerare illustrativi di essa e non limitativi della relativa portata.

BSS.001

*Notarbartolo & Servasi S.r.l.*Esempio 1

Separazione della beta-caseina dalla caseina acida e recupero delle restanti frazioni alfa- e Kappa-caseina.

Preparazione carica

- 200 g Caseina acida + 3000 ml Tampone C: Acetato di Sodio 20mM, Urea 4 M, Ditioltreitolo (DTT) 10 mM, pH 7.

Occorre sciogliere lentamente la caseina nel tampone, mantenendo ad ogni aggiunta il pH al valore 7 con NaOH 2M.

Lasciare in agitazione a 5°C per circa 12 ore.

Filtrazione della soluzione in prefiltro Millex AP-50 (Millipore).

Lavaggio del prefiltro con 1000 ml di Tampone C e recupero.

Portare il carico (4000 ml) a pH 5,5 con HCl 6 M e aggiustare la forza ionica (2,2 mS) a 4,5 mS.

Cromatografia Preparativa

- FPLC Waters 600 Controller

- Rivelatore: Spettrofotometro Perkin Elmer UV/VIS Lambda3B 280nm

- Colonna: XK 50 Pharmacia (pressione limite 3 bar) Ø5cm, h 100cm

- Resina: S-Sepharose Pharmacia h letto 85 cm, volume complessivo 1670 ml

- Eluenti: Tampone A      Acetato di Sodio 20 mM  
                              Urea 4 M  
                              pH 5,5    forza ionica 1,5 mS

Tampone B      Acetato di Sodio 20 mM  
                              Urea 4 M  
                              pH 5,5  
                              Cloruro di Sodio 1 M    forza ionica 57,1  
                              mS

BSS.001

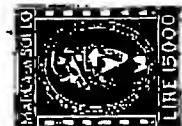
*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

Tutti i tamponi vengono filtrati mediante un prefiltro Millex AP 50 collegato in serie con un filtro 0,45 µm Millipak 20 (Millipore).

- Temperatura: Ambiente

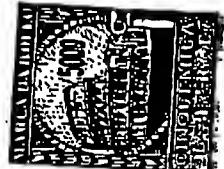
- Condizionamento: ~ 8000 ml

Tampone A 97% Tampone B 3% forza ionica mix 4.5 mS  
Flusso 30 ml/min P=42 PSI  
Tempo 4h 25'



- Caricamento: 200 g Caseina Acida dissolta in Tampone C (volume totale 4000 ml)

Flusso 20ml/min P=50PSI  
Tempo 3h 20'



- Eluizione: 1° Stadio (isocratica) ~ 8000 ml

Tamp. A 97% Tamp. B 3%  
Flusso 30 ml/min P=42 PSI  
Tempo 4h 25'

2° Stadio (isocratica) ~ 9000 ml

Tamp. A 20% Tamp. B 80%  
Flusso 30 ml/min P=42 PSI  
Tempo 5h

#### Esempio 2 - Prova di controllo

E' stata sottoposta a cromatografia un'aliquota del prodotto dell'esempio 1 per controllare l'assenza di Beta-caseina nell'isocratica del secondo stadio. Tale assenza è stata confermata come risulta dal chromatogramma di fig. 3. Per confronto in fig. 1 è illustrato il chromatogramma relativo alla carica iniziale, mentre fig. 2 mostra il picco relativo alla presenza della sola beta-caseina derivante dall'eluizione del primo stadio.

#### Cromatografia Analitica

- HPLC Perkin Elmer Biocompatibile Binary Pump 250

BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

- Rivelatore: Perkin Elmer LC95 280 nm
- Colonna: Mono S HR 5/5 Pharmacia
- Loop: 100  $\mu$ l
- Eluenti: Tampone A\*    Acetato di Sodio 20 mM  
                              Urea 6 M  
                              pH 5
- Tampone B\*    Acetato di Sodio 20 mM  
                              Urea 6 M  
                              Cloruro di Sodio 1 M  
                              pH 5
- Temperatura: Ambiente
- Flusso: 1 ml/min
- Condizionamento: 8'00" Tampone A\* 100% Tampone B\* 0%
- Eluizione: gradiente 5'00" Tampone A\* 50% Tampone B\* 50%  
(incremento di B\* 1% minuto)  
isocratica 2'00" Tampone A\* 50% Tampone B\* 50%  
isocratica 5'00" Tampone A\* 0% Tampone B+ 100%

Esempio 3

Il prodotto dell'esempio 1 è stato purificazione dall'urea con il seguente metodo di diafiltrazione.

- Impianto di Ultrafiltrazione S.G.I.
- Membrana di Cellulosa S-10 10.000 Da Amicon
- Tampone di dialisi: Acqua demineralizzata  
                              Acetato di Sodio 10 mM pH 7  
                              Forza ionica 0,8 mS  
                              Volume complessivo 250 l (5 lavaggi)
- Flusso di permeato: 32+37 l/h
- Temperatura: 10°C
- Concentrazione prodotto 50 l fino 20 l.

BSS.001

Notarbartolo &amp; Gervasi S.r.l.

Il prodotto è stato quindi testato per verificare l'assenza di urea nel modo seguente.

Test Urea

- metodo UV Boehringer Mannheim
- Spettrofotometro: Perkin Elmer Lambda 3B 340 nm

REATTIVI	BIANCO	CAMPIONE
Soluzione 1	1,00 ml	1,00 ml
Soluzione campione	-	0,10 ml
Soluzione 2	0,02 ml	0,02 ml
Acqua bidist.	2,00 ml	1,90 ml

Incubare 5' a 20-25°C leggere l'assorbanza (A1)

Soluzione 3	0,02 ml	0,02 ml
-------------	---------	---------

Incubare 20' a 20-25°C leggere l'assorbanza (A2)

Soluzione 1 = Tampone trietanolammina pH 8,2-oxoglutarato, NADH

Soluzione 2 = Ureasi

Soluzione 3 = Glutammato deidrogenasi

Sul prodotto privo di urea è stata condotta la liofilizzazione con apparecchiatura Christ modello Beta 1-16

Roma,

22 DIC. 1995

/PV

Per BIOSISTEMA di Pier Luigi Sparapani & C. sas

il mandatario

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI SRL

BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

## RIVENDICAZIONI

1. Beta-caseina o frammenti peptidici non immunogenici per mimetismo molecolare con la proteina GLUT 2 da impiegare per preparare prodotti dietetici o farmaceutici da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente.
2. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente sostanzialmente esente da beta-caseina non umana.
3. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente sostanzialmente esente da beta-caseina proveniente da mammiferi non umani che risulti immunogenica per mimetismo molecolare con la proteina GLUT 2.
4. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente sostanzialmente esente da beta-caseina proveniente da mammiferi non umani che risulti immunogenica per mimetismo molecolare con la proteina GLUT 2 e additivato con beta-caseine non immunogeniche di tipo animale e/o vegetale e/o sintetico e relative miscele.
5. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente sostanzialmente esente da caseine che presentano la sequenza: Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro o le sequenze che li contengono: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-

BSS.001

*Notarbartolo & Gezvazi S.r.l.*

Asn o Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn.

6. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente comprendente caseine che non presentano la sequenza: Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro, dette caseine essendo scelte fra quelle in cui:

- alcuni o tutti gli amminoacidi di dette sequenze sono modificati
- dette sequenze sono rimosse
- dette sequenze sono sostituite con la sequenza omologa della beta-caseina umana

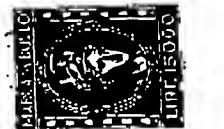
e relative miscele.

7. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente comprendente caseine che presentano la sequenza Val-Glu-Pro-Ile-Pro o una sequenza più ampia che la comprende: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr.

8. Prodotto secondo le riv. 1-7 comprendente Beta-caseine immunogeniche in quantità inferiore al 10% in peso.

9. Prodotto secondo le riv. 2-8 e integrato con beta-caseine vegetali e/o animali e/o sintetiche e/o con peptidi derivati dall'idrolisi di proteine animali e/o vegetali e/o sintetiche, privi della sequenza Pro-Gly-Pro-Ile-His o Pro-Gly-Pro-Ile-Pro e relative miscele.

10. Prodotto dietetico o farmaceutico, derivato da latte o latte stesso, da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-



BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

dipendente comprendente caseine in cui la beta-caseina è priva della sequenza amminoacidica Gly-Pro-Ile-His o Gly-Pro-Ile-Pro perchè prodotta da specie animali che geneticamente non producono proteine con detta sequenza.

11. Latte naturalmente privo di beta-caseine perchè prodotto con animali geneticamente modificati da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente.

12. Latte contenente beta-caseine umane ottenute a partire da microorganismi o animali geneticamente manipolati da impiegare nelle diete preventive del diabete insulino-dipendente.

13. Processo di estrazione della betà-caseina da latte comprendente l'impiego, come fase stazionaria, di una resina a scambio ionico, la fase mobile essendo costituita da tampone A:

- Acetato di sodio con concentrazione non inferiore a 10 mM
- urea con concentrazione non inferiore a 2M
- pH compreso fra 5 e 6.

detto metodo prevedendo l'utilizzo di caseina acida che viene preventivamente dissolta in tampone A: a pH non inferiore a 6, additivata con ditiotreitolo e poi lasciata sotto agitazione per 24 ore, quindi portata a pH fra 5 e 6 e caricata in colonna, facendo poi eluire a concentrazione 0 M di NaCl; le altre frazioni contenenti beta-caseina essendo recuperate in isocratica eluendo con tampone B:

- Acetato di sodio con concentrazione non inferiore a 10 mM
- urea con concentrazione non inferiore a 2M

BSS.001

*Notarbartolo & Gervasi S.r.l.*

- concentrazione 0,8 M di NaCl

- pH compreso fra 5 e 6,

successiva eliminazione di urea ed altre impurezze per diafiltrazione e, dopo concentrazione, recupero delle caseine per precipitazione acida e liofilizzazione del prodotto umido ottenuto.

14. Procedimento per ottenere un prodotto alimentare secondo la riv. 6 in cui le sequenze amminoacidiche sono modificate applicando tecniche scelte fra quelle di ingegneria genetica e le tecniche biologiche di selezione e incrocio.

15. Uso di beta-caseine o frammenti peptidici secondo la riv. 1 per la prevenzione del diabete insulino-dipendente.

16. Uso di un prodotto alimentare, dietetico o farmaceutico secondo le riv. 2-10 per la prevenzione del diabete insulino-dipendente.

17. Uso di latte secondo le riv. 11 e 12 per la prevenzione del diabete insulino-dipendente.

Roma,

/PV

Per BIOSISTEMA di Pier Luigi Sparapani & C. sas

il mandatario

*Maria Vittoria Primiceri*  
Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI SRL

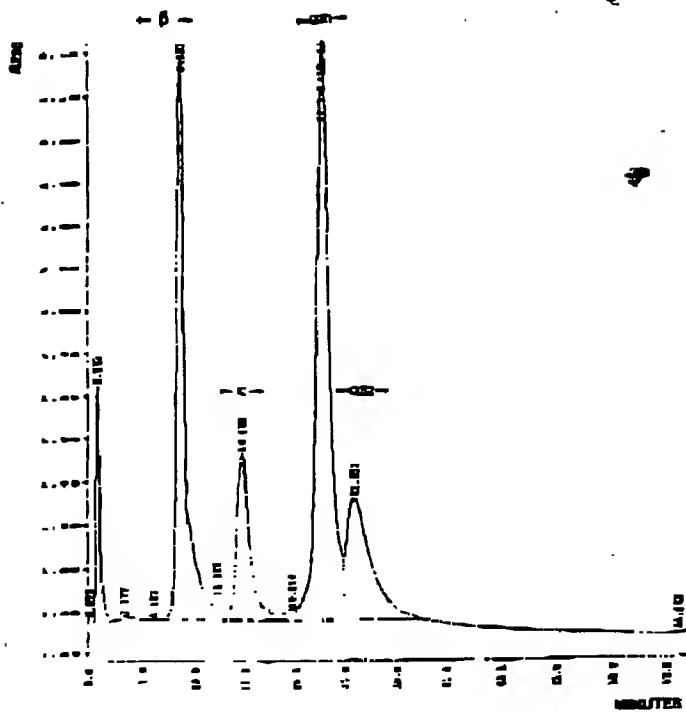


Fig. 1. Cromatogramma HPLC di cromato estratto

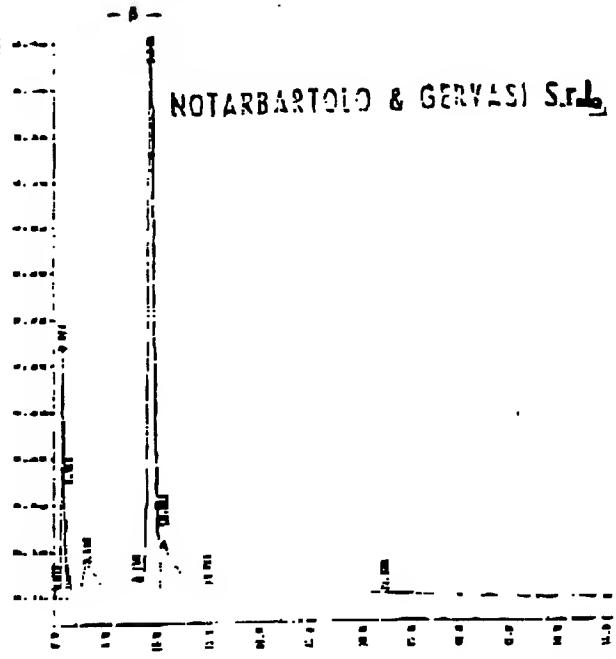


Fig. 2. Cromatogramma HPLC di cromato cromato dopo il 1° passo cromatografico

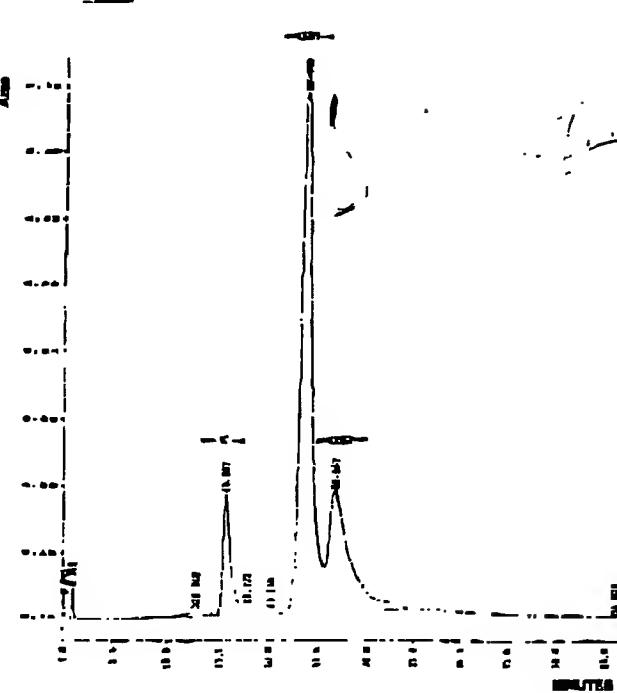


Fig. 3. Cromatogramma HPLC di cromato cromato cromato dopo il 2° passo cromatografico

*Mario Vittore, Consiglio  
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.*

USPTO/PCT LEGAL

703 308 6459

\*\*\*\*\*  
\*\*\* RX REPORT \*\*\*  
\*\*\*\*\*

RECEPTION OK

TX/RX NO	5970
CONNECTION TEL	41 22 740 14 35
CONNECTION ID	PCT EXAM SECTION
START TIME	06/21(WE)05:06
USAGE TIME	09'11"
PGS.	25
RESULT	OK